

L1 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX COPYRIGHT 2008

THOMSON REUTERS on STN

Full
Text

AN 2002-077303 [11] WPINDEX

CR 2002-077302

DNC C2002-023270 [11]

TI New bacteriocin, sakacine G, useful for controlling microbes, particularly Listeria monocytogenes, in foods, is derived from Lactobacillus sakei 2512

DC D13; D16

IN BERJEAUD J; BERJEAUD J M; CENATIEMPO Y; FREMAUX C; SIMON L; BERJEAUD J -

EA (RHOD-C) RHODIA CHIM; (RHOD-C) RHODIA FOOD; (DERJ-I) BERJEAUD J; (CENA-I)

CENATIEMPO Y; (FREM-I) FREMAUX C; (SIMO-I) SIMON L; (DANI-N) DANISCO AS

CYC 95

PIA FR 2809404 A1 20011130 (200211)* FR 29[1]

WO 2001092533 A1 20011206 (200211) FR

AU 2001064038 A 20011211 (200225) EN

EP 1285069 A1 20030226 (200319) FR

BR 2001011265 A 20030617 (200347) PT

CN 1436238 A 20030813 (200373) ZH

JP 2004504815 W 20040219 (200414) JA 55

US 20040214173 A1 20041028 (200471) EN

US 6855518 B2 20050215 (200513) EN

RU 2250267 C2 20050420 (200528) RU

US 20050232910 A1 20051020 (200569) EN

AU 2001264038 B2 20060202 (200656) EN

US 7238515 B2 20070703 (200746) EN

CN 1300317 C 20070214 (200749) ZH

EP 1927661 A2 20080604 (200837) FR

EP 1285069 B1 20080813 (200856) FR

DE 60135325 E 20080925 (200864) DE

EP 1927661 A3 20081015 (200868) FR

ADT FR 2809404 A1 FR 2000-13407 20001019; AU 2001064038 A AU 2001-64038 20010528; AU 2001264038 B2 AU 2001-264038 20010528; BR 2001011265 A BR 2001-11265 20010528; CN 1436238 A CN 2001-811257 20010528; CN 1300317 C CN 2001-811257 20010528; DE 60135325 E DE 2001-60135325 20010528; EP 1285069 A1 EP 2001-938357 20010528; EP 1927661 A2 Div Ex EP 2001-938357 20010528; EP 1285069 B1 EP 2001-938357 20010528; DE 60135325 E EP 2001-938357 20010528; US 7238515 B2 Div Ex US 2001-296723 20010528; WO 2001092533 A1 WO 2001-FR1642 20010528; EP 1285069 A1 PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; BR 2001011265 A PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; JP 2004504815 W PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; US 20040214173 A1 PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; US 6855518 B2 PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; RU 2250267 C2 PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; US 20050232910 A1 Cont of WO 2001-FR1642 20010528; US 7238515 B2 Div Ex WO 2001-FR1642 20010528; EP 1285069 B1 PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; DE 60135325 E PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; JP 2004504815 W JP 2002-500725 20010528; RU 2250267 C2 RU 2002-135601 20010528; US 20040214173 A1 US 2002-296723 20021126; US 6855518 B2 US 2002-296723 20021126; US 20050232910 A1 Cont of US 2002-296723 20021126; US 20050232910 A1 US 2005-28505 20050104; US 7238515 B2 US 2005-28505 20050104; EP 1927661 A2 EP 2008-101852 20010528; EP 1285069 B1 Related to EP 2008-101852 20080221; EP 1927661 A3 Div Ex EP 2001-938357 20010528; EP 1927661 A3 EP 2008-101852 20010528

FDT EP 1927661 A2 Div ex EP 1285069 A; DE 60135325 E Based on EP 1285069 A; EP 1285069 B1 Related to EP 1927661 A; US 20050232910 A1 Cont of US 6855518 B; US 7238515 B2 Div ex US 6855518 B; AU 2001064038 A Based on WO 2001092533 A; EP 1285069 A1 Based on WO 2001092533 A; BR 2001011265 A Based on WO 2001092533 A; JP 2004504815 W Based on WO 2001092533 A; US 6855518 B2 Based on WO 2001092533 A; RU 2250267 C2 Based on WO 2001092533 A; AU 2001264038 B2 Based on WO 2001092533 A; EP 1285069 B1 Based on WO 2001092533 A; DE 60135325 E Based on WO 2001092533 A; EP 1927661 A3 Div ex EP 1285069 A

PRAI FR 2000-6859 20000529

AN FR 2000-13407 20001019
 CR 2002-077303 [11] WPINDEX
 AB 2002-077302
 FR 2809404 A1 UPAB: 20060118

NOVELTY - Isolated polypeptide (I), designated sakacine G, is a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* 2512.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

- (1) nucleic acid (II) that encodes (I);
- (2) cloning and/or expression vector containing (II);
- (3) host cell transformed with the vector of (2);
- (4) preparation of recombinant (I) by culturing cells of (3); and
- (5) composition comprising at least one (I) or *L. sakei* 2512.

ACTIVITY - Antibacterial. In a test on bacteria growing in gelled medium, (I) inhibited *Listeria ivanovii* BUG 496; *Listeria innocua* 8811; *Enterococcus durans*; *E. faecalis*; *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus sakei* 2515.

MECHANISM OF ACTION - None given in the source material.

USE - (I) is used to control pathogenic or unwanted microorganisms in food processing (claimed) and (not claimed) in medical, veterinary and cosmetic products, most particularly *Listeria monocytogenes*. (I) may be generated in foods by fermentation with *L. sakei* 2512.

ADVANTAGE - (I) is a particularly effective inhibitor of *Listeria monocytogenes*.

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication : **2 809 404**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **00 13407**

⑤① Int Cl⁷ : C 07 K 14/335, C 12 N 15/31, 15/63, A 23 L 3/3571, 3/
3526 // (C 12 N 15/31, C 12 R 1:225)

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ BACTERIOCINE ANTI-LISTERIA.

②② Date de dépôt : 19.10.00.

③③ Priorité : 29.05.00 FR 00006859.

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : RHODIA FOOD Société par actions
simplifiée — FR.

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 30.11.01 Bulletin 01/48.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 30.08.02 Bulletin 02/35.

⑦② Inventeur(s) : BERJEAUD JEAN MARC, FREMAUX
CHRISTOPHE, GENATIMPO YVES et SIMON
LAURENCE.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

⑦③ Titulaire(s) : RHODIA CHIMIE.

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

FR 2 809 404 - B1



La présente invention concerne une bactériocine de *Lactobacillus sakei* et plus particulièrement de *Lactobacillus sakei* 2512, une séquence nucléotidique codant pour cette bactériocine, et l'utilisation industrielle de cette bactériocine comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables dans la préparation
5 de produits alimentaires.

Les bactéries lactiques sont utilisées intensivement dans les fermentations alimentaires afin, non seulement d'améliorer la saveur et la texture des aliments mais surtout pour allonger leur durée de conservation. De nombreuses bactéries lactiques ont en effet la faculté d'inhiber la croissance de certaines bactéries à
10 Gram positif, dont des souches pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, grâce à l'excrétion de molécules antagonistes, parmi lesquelles des composés peptidiques. Ces composés peptidiques, appelés bactériocines, présentent donc un potentiel intéressant pour la préservation qualitative et sanitaire de produits alimentaires fermentés.

A titre représentatif de ces bactériocines, on peut notamment citer celles formant la sous-classe de polypeptides dénommés bactériocines anti-*Listeria*, bactériocines de classe IIa (Ennahar S. *et al.*, 2000, FEMS Microbiol. Rev., 24 :85-106) et cystibiotiques (Jack R. *et al.*, 1995, Microbiol. Rev., 59(2) :171-200). Il a été fait récemment état de l'utilisation potentielle d'une de ces
20 bactériocines de classe IIa, la divercine V41, pour empêcher la croissance de *Listeria monocytogenes* dans du saumon fumé (Duffes F. *et al.*, 1999, J. Food Prot., 62(12) :1394-1403).

Les séquences de ces polypeptides présentent de fortes similitudes dans leur partie N-terminale, avec en particulier la présence d'un pont disulfure. La
25 partie C-terminale hydrophobe est beaucoup plus variable, toutefois certains de ces bactériocines, dites de type pédiocine (pédiocine PA-1, entéroline A et divercine V41), se caractérisent par une taille supérieure à 40 résidus et la présence d'un deuxième pont disulfure du côté C-terminal.

Les auteurs de la présente invention ont mis en évidence une nouvelle
30 bactériocine de classe IIa produite à partir d'une souche spécifique de

Lactobacillus sakei, qui s'avère particulièrement efficace pour inhiber la croissance de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*.

En accord avec Tagg J.R. *et al.*, Bacteriol. Rev., 40 ; 722-756 (1976), le terme "Bactériocine" au sens de l'invention fait référence à un polypeptide
5 produit, par synthèse ribosomique, à partir de microorganismes, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres bactéries.

La présente invention a donc pour premier objet un polypeptide issu de la souche *Lactobacillus sakei* 2512, doté d'une activité bactériocine.

10 La souche *Lactobacillus sakei* 2512 a été déposée le 25 mai 2000 auprès de la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes où elle est enregistrée sous le numéro de dépôt I - 2479.

La bactériocine objet de la présente invention a été dénommée Sakacine G. Il s'agit d'un polypeptide possédant une masse moléculaire de l'ordre de 3700
15 à 3900 et préférentiellement d'environ 3834 Da déterminée par spectrométrie de masse. Elle possède un spectre d'inhibition bactérienne très apparenté à celui des bactériocines de classe IIa. C'est ainsi qu'elle s'avère particulièrement efficace contre les souches de *Lactobacillus sakei* autres que le *Lactobacillus sakei* 2512, *Pediococcus cerevisiae*, l'ensemble des souches *Listeria* et contre les
20 *Enterococcus faecalis* et *durans*. En revanche, elle s'avère inactive contre les autres espèces de *Lactobacillus* comme par exemple le *Lactobacillus debrueckii*, le *Lactobacillus plantarum*, le *Lactobacillus brevis*, le *Lactobacillus casei*, et une souche d'*Enterococcus faecium*.

A l'image des bactériocines anti-*Listeria* de type pédiocine, la Sakacine
25 G possède dans sa structure peptidique avantageusement deux ponts disulfures.

Une analyse des déterminants génétiques de plusieurs bactériocines de classe IIa a montré que les gènes impliqués dans leurs production, transport et immunité, sont organisés en une ou plusieurs structures de type opéron. Ces opérons ont une localisation souvent plasmidique et possèdent généralement au
30 moins deux gènes codant pour des protéines, homologues à un ABC-transporteur

et une protéine accessoire, probablement impliquée dans l'export des bactériocines.

Le clonage du fragment nucléotidique (SEQ ID N° 9) contenant le gène de la Sakacine G a révélé l'existence de deux cadres ouverts de lecture complets
5 *skgA1* (SEQ ID N°1) et *skgA2* (SEQ ID N°3) et de deux autres tronqués *skgI* (SEQ ID N°5) et *skgD* (SEQ ID N°7) situés aux deux extrémités du fragment cloné dont une représentation schématique est présentée en figure 1.

Les produits des gènes *skgA1* et *skgA2*, appelés pré-bactériocines, peuvent subir une maturation au cours de laquelle leurs peptides leaders respectifs
10 sont clivés entre les résidus 18 et 19, libérant ainsi la Sakacine G active (résidus 19-55).

La présente invention a donc également pour objet un polypeptide isolé correspondant à une bactériocine, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N°2 et/ou la séquence ID N°4. La séquence de la bactériocine mature comprend la
15 séquence ID N°12.

Le cadre de lecture appelé *skgI* code une protéine de 54 résidus. La comparaison de cette séquence avec celle des banques de données montre de fortes similitudes de SkgI avec des protéines dites d'immunité. Elle code vraisemblablement pour la protéine d'immunité protégeant la bactérie productrice
20 de la Sakacine G.

La présente invention s'étend également à un polypeptide isolé comprenant la séquence ID N°6 correspondant au cadre de lecture *skgI*.

En ce qui concerne le dernier gène *skgD*, il code pour une portion de protéine qui présente une homologie avec des protéines de la famille des ABC-
25 transporteurs, et plus particulièrement du transporteur de la pédiocine PA-1. Le gène *skgD* code vraisemblablement pour l'ABC-transporteur spécifique de la Sakacine G.

La présente invention s'étend également au polypeptide isolé comprenant la séquence ID N°8 correspondant à ce gène dit *skgD*.

30 Il est entendu que sont également comprises les séquences homologues, définies comme

i) les séquences similaires à au moins 70% de la séquence SEQ ID N° 2, N° 4, N° 6, N° 8 ou N° 12 ; ou

ii) les séquences codées par une séquence d'acide nucléique homologue telle que définie ci-après c'est-à-dire une séquence d'acide nucléique hybridant avec la séquence SEQ ID N° 1, N° 3, N° 5, N° 7 ou N° 9 ou sa séquence complémentaire, dans des conditions stringentes d'hybridation.

Là encore, le terme "similaires" se réfère à la ressemblance parfaite ou identité entre les acides aminés des séquences homologues comparées mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de similitudes dans une séquence polypeptidique prend en compte les substitutions conservatives qui sont des substitutions d'acides aminés de même classe, telles que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la serine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique) ; d'acides aminés aux chaînes latérales apolaires (tels que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine).

Plus généralement, par "séquence d'acides aminés homologue", on entend donc toute séquence d'acides aminés qui diffère de la séquence SEQ ID N° 2, N° 4, N° 6, N° 8 ou N° 12 par substitution, délétion et/ou insertion d'un acide aminé ou d'un nombre réduit d'acides aminés, notamment par substitution d'acides aminés naturels par des acides aminés non naturels ou pseudo-acides aminés à des positions telles que ces modifications ne portent pas significativement atteinte à l'activité biologique du polypeptide isolé et de préférence de la Sakacine G.

De préférence, une telle séquence d'acides aminés homologue est similaire à au moins 85 % de la séquence SEQ ID N° 2, N° 4, N° 6, N° 8 ou N° 12, de préférence au moins 95 %.

L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the

Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences d'acides aminés similaires sont alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (i.e. identité ou similitude, comme défini plus haut). A cette fin, il peut être nécessaire d'introduire de manière artificielle des espaces (" gaps ") dans la séquence. Une fois l'alignement optimal réalisé, le degré d'homologie est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides aminés des deux séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions.

L'activité biologique du polypeptide isolé et notamment de la Sakacine G se réfère à sa capacité à inhiber la croissance de souches bactériennes indésirables et/ou pathogènes, de préférence de bactéries *Listeria* et plus particulièrement de bactéries *Listeria monocytogenes*.

La présente invention a également pour objet un acide nucléique isolé, codant pour un polypeptide tel que défini précédemment.

Plus précisément, la présente invention a pour objet un acide nucléique isolé comprenant la séquence ID N°1 et/ou la séquence ID N°3.

La séquence nucléotidique complète de la région impliquée dans l'expression de la Sakacine G (2042 pb) a été déterminée, et est représentée en séquence ID N°9. La présente invention vise également un acide nucléique comprenant une telle séquence.

Comme décrit précédemment, cette séquence possède deux cadres ouverts de lecture complets *skgA1* et *skgA2* et de deux autres tronqués, *skgI* et *skgD* situés aux deux extrémités du fragment cloné. Les gènes supposés *skgA1* (SEQ ID N°1), *skgA2* (SEQ ID N°3) et *skgI* (SEQ ID N°5) y sont orientés en sens inverse par rapport à *skgD* (SEQ ID N°7).

Sont également revendiqués dans le cadre de la présente invention, l'acide nucléique comprenant la séquence ID N°5 ainsi que l'acide nucléique comprenant la séquence ID N°7.

Il est entendu que sont également comprises les séquences homologues, définies comme :

i) des séquences similaires à au moins 70 % de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 ; ou

ii) des séquences hybridant avec la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 ou leur séquence complémentaire, dans des conditions
5 stringentes d'hybridation, ou

iii) des séquences codant pour le polypeptide dénommé Sakacine G, tel que défini précédemment.

De préférence, une séquence nucléotidique homologue selon l'invention est similaire à au moins 75 % des séquences SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9,
10 de préférence encore au moins 85 %, ou au moins 90 %.

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue hybride spécifiquement aux séquences complémentaires de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 dans des conditions stringentes. Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle
15 50% des brins appariés se séparent (T_m).

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases, T_m est définie par la relation (Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory) :

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \text{ Log}(\text{concentration en cations}) - 0,63(\%\text{formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$$

20 Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases, T_m est définie par la relation :

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T).$$

Dans des conditions de stringence appropriées, auxquelles les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation peut être de préférence
25 de 5 à 10°C en dessous de T_m , et les tampons d'hybridation utilisés sont de préférence des solutions de force ionique élevée telle qu'une solution 6xSSC par exemple.

Le terme "séquences similaires" employé plus haut se réfère à la ressemblance parfaite ou identité entre les nucléotides comparés mais aussi à la
30 ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de similitudes dans les séquences nucléiques distingue par exemple les purines et les

pyrimidines.

Une séquence nucléotidique homologue aux cadres ouverts de lecture représentés en SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 inclut donc toute séquence nucléotidique qui diffère de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 par
5 mutation, insertion, délétion ou substitution d'une ou plusieurs bases, ou par la dégénérescence du code génétique, pour autant qu'elle code pour un polypeptide présentant l'activité biologique de la Sakacine G, comme définie ci-après.

Parmi de telles séquences homologues, sont comprises les séquences des gènes de bactéries autres que *Lactobacillus*, codant pour la Sakacine G.

10 Les polypeptides de la présente invention peuvent être synthétisés par toutes les méthodes bien connues de l'homme du métier. Les polypeptides de l'invention peuvent par exemple être synthétisés par les techniques de la chimie de synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse pour des raisons de pureté, de spécificité antigénique, d'absence de produits secondaires
15 non désirés et pour sa facilité de production.

La présente invention a également pour objet un procédé de production d'un polypeptide recombinant dans lequel un vecteur comprenant un acide nucléique conforme à la présente invention est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide
20 conforme à la présente invention ou d'un polypeptide codé par une séquence d'acide nucléique conforme à la présente invention.

La bactériocine recombinante peut également être produite par un procédé, dans lequel un vecteur contenant un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique conforme à l'invention et de préférence les séquences
25 SEQ ID N°1 et/ou N°3 où une séquence homologue est transférée dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression du polypeptide correspondant. La protéine produite peut ensuite être récupérée et purifiée. Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant obtenu peut être purifié à partir de lysats et extraits
30 cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de

chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux spécifiques, etc.

La séquence d'acide nucléique d'intérêt, codant pour la Sakacine G, peut
5 être insérée dans un vecteur d'expression, dans lequel elle est liée de manière
opérante à des éléments permettant la régulation de son expression, tels que
notamment des promoteurs, activateurs et/ou terminateurs de transcription. Les
signaux contrôlant l'expression des séquences nucléotidiques (promoteurs,
activateurs, séquences de terminaison...) sont choisis en fonction de l'hôte
10 cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention
peuvent être insérées dans des vecteurs à répllication autonome au sein de l'hôte
choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés
selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en
résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes
15 standard, telles que par exemple l'électroporation ou la précipitation au phosphate
de calcium.

Les vecteurs de clonage et/ou d'expression tels que décrits ci-dessus,
contenant une séquence nucléotidique définie selon l'invention font également
partie de la présente invention.
20

L'invention vise en outre les cellules hôtes transformées, de manière
transitoire ou stable, par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être
obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes, de préférence procaryotes,
d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis
25 la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la répllication
et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transférée.

Des exemples de cellules hôtes incluent notamment des bactéries telles
que *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*,
Escherichia et les levures.

30 Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine
artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN ou d'ARN, obtenues par

criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base des séquences SEQ ID N°1, N°3, N°5, et/ou N°7 ou N°9. De telles banques peuvent être préparées par des techniques classiques de biologie moléculaire, connues de l'homme de l'art.

5 Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques.

10 La présente invention se rapporte également à un procédé pour inhiber la croissance de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes* dans un environnement qui peut être alimentaire ou non et qui est susceptible d'être contaminé avec les *Listeria monocytogenes*.

Les *Listeria monocytogenes* sont des microorganismes pathogènes qui
15 sont à l'origine de sévères maladies chez les êtres humains et animaux et qui peuvent notamment être facilement transmissibles par des aliments contaminés, plus spécialement au moyen de viandes, de produits carnés, de produits marins, de lait et de produits dérivés. La présente invention propose donc un procédé pour inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes* dans un aliment susceptible de
20 contenir des *Listeria monocytogenes* à titre de contaminant, ledit procédé comprenant l'addition d'un polypeptide conforme à l'invention dans ledit aliment en une quantité suffisante pour inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes*.

Les bactériocines conformes à l'invention sont de préférence utilisées dans tout système alimentaire en une quantité comprise entre 1 et 100000 unités
25 arbitraires (AU) de bactériocines par gramme d'aliment.

Une AU de bactériocines est définie comme 5 µl de la dilution la plus élevée du surnageant de culture conduisant à une zone définie d'inhibition de croissance par rapport à une souche témoin d'une bactérie à Gram positif sur un milieu agar.

30 Bien que les aliments soient les plus concernés par une contamination par *Listeria monocytogenes*, les produits vétérinaires et médicaux peuvent également

être contaminés avec ce type de bactéries, de même que les produits cosmétiques ou produits apparentés.

Les bactériocines conformes à la présente invention, et notamment la Sakacine G, sont donc également utiles pour inhiber la croissance de ce type de pathogènes dans ces produits.

La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation d'une bactériocine conforme à la présente invention comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables notamment dans la préparation de produits alimentaires et plus précisément pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans les produits alimentaires.

Le polypeptide peut être incorporé tel quel dans le produit alimentaire considéré ou encore y être produit à partir de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512.

La présente invention a ainsi également pour objet l'utilisation de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 dans un produit alimentaire pour y générer un polypeptide bactériocine conforme à l'invention.

L'invention concerne encore une composition bactériocine, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide conforme à la présente invention, c'est-à-dire issue de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 ou comprenant la séquence SEQ ID N°2, ou N°4, ou N°12 ou la souche *Lactobacillus Sakei* 2512.

L'invention s'étend également à l'utilisation de la souche *Lactobacillus sakei* 2512 destinée à produire un polypeptide tel que défini plus haut, pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans des produits alimentaires ainsi que les compositions comportant de telle souche.

25

Les exemples et la figure ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de l'objet de la présente invention.

FIGURE :

Figure 1 : Représentation schématique du locus génétique impliqué dans la production de la sakacine G.

5

MATERIELS ET METHODES

• Souches bactériennes et milieux de culture. *Lactobacillus sakei* 2512 est cultivée à 30°C en milieu MRS (DIFCO Laboratories) stérilisé 12 min à 110°C. Les souches indicatrices sont cultivées en milieu BHI ("brain-heart infusion"; DIFCO Laboratories) à 37°C.

10

• Test d'activité. Du milieu BHI, gélosé à 10g/l, estensemencé à 1% par une préculture de souche indicatrice en phase stationnaire avant d'être coulé en boîte de Petri. Cinquante microlitres de solution de sakacine G sont déposés dans des puits creusés dans la gélose refroidie à l'emporte pièce. L'activité bactériocine se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits après incubation une nuit à 37°C.

15

• Analyse protéique. La sakacine G est analysée en spectrométrie de masse sur un appareil Perkin-Elmer Sciex API 165 équipé d'une source d'ionisation par Ionspray. Après lyophilisation, la fraction HPLC active est reprise avec une solution acétonitrile / eau (1:1) contenant 0,1% d'acide formique puis injectée par infusion à un débit de 5 µl/min.

20

La concentration protéique est déterminée par la méthode à l'acide bicinchoninique au moyen du kit BCA (Sigma) selon les instructions du fabricant.

25

Les comparaisons de séquences protéiques sont réalisées grâce au programme BLAST (1), accessible à partir du serveur EXPASy du "Swiss Institute of Bioinformatics".

• Clonage moléculaire et transformation. Les plasmides sont extraits et purifiés à partir de souches d'*Escherichia coli* et de *Lactobacillus sakei* 2512 selon les méthodes décrites précédemment par Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold

30

Spring Harbor Laboratory et Muriana et Klaenhammer, 1987, Appl. Environ. Microbiol., 53 :553-560 respectivement.

Les enzymes de restriction et de modification de l'ADN sont utilisées selon les indications du fournisseur (Gibco-BRL). Les électrophorèses en gel
5 d'agarose, analytique et préparative, sont conduites en tampon Tris/borate/EDTA (pH 8,3) selon les méthodes décrites par Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory. Les fragments d'ADN digérés sont purifiés à partir des gels d'agarose en utilisant le kit "Prep-a-Gene" (Bio-Rad). Les clonages dans les plasmides pGEM-T (Promega) et pZERO2 (Invitrogen) sont réalisés selon les
10 recommandations des fournisseurs. Le transfert de type Southern est réalisé sur membrane de nylon (Hybond-N+, Amersham) selon Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory. Le transfert est suivi d'une hybridation avec une sonde radioactive obtenue par marquage au ^{32}P à l'aide du kit "random primers DNA labelling system" (Gibco-BRL). Les bactéries *E. coli* sont rendues
15 compétentes et transformées selon la méthode de Hanahan, 1983. J. Mol. Biol. 166:557-80.

La Taq polymérase (Gibco-BRL) est utilisée selon les recommandations du fournisseur. L'amplification du fragment d'ADN codant la Sakacine G a été réalisée à l'aide d'un appareil "Geneamp 9700®" (Perkin-Elmer) selon les
20 conditions suivantes : 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à 45°C pendant 30 s et élongation à 72°C pendant 1 min suivis d'un cycle supplémentaire d'élongation à 72°C pendant 5 min.

Le fragment d'ADN portant le locus sakacine G est séquencé à l'aide d'un séquenceur automatique ABI Prism 310® (Perkin-Elmer) en utilisant le kit de
25 séquençage "Big-dye terminator®" (Perkin-Elmer) et les amorces nucléotidiques appropriées.

EXEMPLE 1 :

Isolement et purification de la Sakacine G.

30 Une culture de 16 h de *Lactobacillus sakei* 2512 (100 ml) est centrifugée à 6000g pendant 15 min. Le surnageant de culture est ensuite chauffé à 70°C

pendant 20 min. Le surnageant refroidi est ensuite dilué avec 1 volume d'eau (le pH de la solution diluée doit être inférieur à 6, par addition d'HCl 1M si nécessaire) avant d'être passé sur une colonne (2.5 x 18 cm) contenant une résine échangeuse de cations (carboxy-méthyl cellulose; Cellufine C-200, Amicon) 5 équilibrée avec de l'eau. Après des lavages successifs avec de l'eau (100 ml) puis une solution de NaCl 0,1M (150 ml), la Sakacine G est éluée avec une solution de NaCl 0,5M (200 ml). Le pH de toutes les solutions doit être inférieur à 6. La fraction active est ensuite déposée sur cartouche d'extraction en phase solide (Sep-pak plus C18, Waters) équilibrée dans l'eau. Après lavages successifs avec 5 ml de 10 solutions d'acétate d'ammonium 20 mM contenant 0, 10, 20 et 30% d'acétonitrile, la Sakacine G est éluée avec 10 ml d'acétate d'ammonium 20 mM contenant 80% d'acétonitrile. Après lyophilisation, l'extrait est solubilisé dans 1 ml de solution aqueuse d'acétonitrile à 40% puis injecté sur une colonne HPLC analytique de phase inverse en C8 (Kromasil, 5µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm, A.I.T.). L'HPLC a été 15 réalisée sur un appareillage comprenant une pompe Perkin-Elmer series 200 LC connectée à un détecteur Perkin-Elmer 785A. Le chromatogramme en absorption est enregistré à 220 nm. La séparation est réalisée, à un débit de 0,8 ml/min selon le gradient suivant : Solvant A = eau/acide trifluoroacétique 0,1%; solvant B = acétonitrile/eau/ acide trifluoroacétique 0,07%. Après un lavage de 5 min avec 20 20% de solvant B, l'élution est réalisée par un gradient de 20 de 40% de solvant B en 10 min puis de 40 à 55% de solvant B en 20 min.

La fraction correspondant au pic à 23 min s'étant révélée active contre *Listeria ivanovii* BUG 496 a été analysée en spectrométrie de masse en ionisation "ionspray". La molécule apparaît pure à au moins 95% et possède une masse 25 moléculaire de $3834,32 \pm 0,31$ Da. La quantité de Sakacine G ainsi purifiée a été estimée à 120 µg à partir de 100 ml de culture. Le rendement de purification a été estimé à 55% d'activité retrouvée. Une partie de la séquence primaire de la Sakacine G a été déterminée par microséquençage et deux oligonucléotides dégénérés ont été établis à partir de cette séquence.

EXEMPLE 2 :

Clonage du locus génétique impliqué dans la production de la sakacine

G.

- 5 Par génétique inverse, les deux oligonucléotides dégénérés SakG01 (5' AARTATTATGGNAAYGGNGT 3') (SEQ ID N°10) et SakG02 (5' ACATGATGNCCNCCRTTNGC 3') (SEQ ID N°11) ont été choisis afin d'amplifier le fragment d'ADN correspondant au gène de structure de la Sakacine G mature (SEQ ID N°12) par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).
- 10 L'amplifiat ainsi obtenu, d'une taille approximative de 100 pb a été cloné dans le plasmide pGEM-T pour former le plasmide pJMBYC01. Le fragment de restriction *PvuII* de 560 pb issu de pJMBYC01, incluant le fragment inséré, a servi de sonde d'hybridation, lors d'un transfert de type Southern, pour localiser le gène de structure sur le génome de *Lactobacillus sakei* 2512. A partir d'un extrait
- 15 plasmidique de *Lactobacillus sakei* 2512 digéré par les enzymes de restriction *HindIII* et *EcoRI*, la sonde a révélé des fragments de tailles respectives d'environ 2,1 et 9 kpb. Le fragment *HindIII* de 2,1 kpb a été purifié puis inséré dans le vecteur pZERO2 pour donner le plasmide pJMBYC02. La présence du gène de structure de la Sakacine G dans pJMBYC02 a été démontrée par amplification
- 20 PCR avec les amorces SakG01 et SakG02 puis par séquençage nucléotidique du fragment inséré dans pJMBYC02.

- La séquence nucléotidique complète (2042 pb) du fragment de restriction *HindIII* inséré dans pJMBYC02 a été déterminée. L'analyse de cette séquence a révélé l'existence de deux cadres ouverts de lecture complets *skgA1* et *skgA2* et de
- 25 deux autres tronqués, *skgI* et *skgD* situés aux deux extrémités du fragment cloné. Les gènes supposés *skgA1* *skgA2* et *skgI* sont orientés en sens inverse par rapport à *skgD*.

- Chacun des cadres ouverts de lecture est précédé d'un site potentiel de fixation des ribosomes. Les gènes *skgA1* et *skgA2* codent tous les deux des
- 30 protéines de 55 résidus d'acides aminés dont les séquences 19-55 sont totalement identiques. La séquence 19-52 correspond à la séquence de la sakacine G obtenue

par microséquençage. La présence supposée de 3 résidus cystéine en positions 9, 14 et 24 est confirmée et trois résidus supplémentaires de glycine, valine et cystéine apparaissent en extrémité C-terminale.

Les séquences 1-18 des protéines SkgA1 et SkgA2 ne diffèrent que de 3
5 résidus et présentent de fortes similitudes avec les peptides "leader" des bactériocines de classe II, qui sont impliquées dans le transport de ces peptides par des ABC-transporteurs spécifiques. En particulier le motif GG terminal (17-18) est caractéristique de ces séquences leader et constitue le site de maturation de ces bactériocines. La comparaison des séquences nucléotidiques des gènes *skgA1* et
10 *skgA2* montre également une identité de séquence de plus de 95% pour la partie des gènes codant la bactériocine mature. Le cadre de lecture ouvert incomplet appelé *skgI* code une protéine de 54 résidus. La comparaison de cette séquence avec celles des banques de données montre de fortes homologues de SkgI avec les protéines dites d'immunité LccI et MesI. L'implication de MesI dans la protection
15 vis à vis de la mésentéricine Y105 a été démontrée. On peut supposer que *skgI* code la protéine d'immunité à la sakacine G.

Le dernier gène *skgD* code une portion de protéine de 394 acides aminés. D'après les banques de données, SkgD est très homologue de protéines de la famille des ABC-transporteurs et plus particulièrement des transporteurs de la
20 pédiocine PA-1 : PedD ou PapD (Marugg J.D. *et al.*, 1992, Appl. Environ. Microbiol. 58(8):2360-7; Motlagh A. *et al.*, 1994, Lett. Appl. Microbiol. 18(6):305-12), de la sakacine P : SppT (Huhne K. *et al.*, 1996, Microbiology. 142(Pt6):1437-48), de la sakacine A : SapT (Axelsson L. *et al.*, 1995, J. Bacteriol. 117(8):2125-37) et de la mésentéricine Y105 : MesD (Fremaux C. *et*
25 *al.*, 1995, Microbiology. 141(Pt 7):1637-45).

EXEMPLE 3 ;

Spectre d'inhibition.

La sensibilité à la Sakacine G de 17 souches bactériennes a été testée par
30 la méthode de test en puits (cf Matériels et Méthodes). Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-après :

TABLEAU 1

	Rayon des halos d'inhibition (mm)
<i>Lc. lactis</i> ATCC11454	0
<i>Ln. Paramesenteroides</i> DSM 20288	0
<i>Ln. Mesenteroides</i> DSM 20484	0
<i>Ln. Mesenteroides</i> DSM 20240	0
<i>Lb. delbrueckii</i> DSM 20081	0
<i>Lb. plantarum</i> DSM 20174	0
<i>Lb. brevis</i> DSM 20054	0
<i>Lb. casei</i> DSM 20011	0
<i>Lb. sakei</i> 2515	1
<i>P. acidilactici</i> ENSAIA 583	0
<i>P. cerevisiae</i> IP 5492	1
<i>E. faecium</i> ENSAIA 631	0
<i>E. faecalis</i> IP 5430	2
<i>E. faecalis</i> ENSAIA 636	1
<i>E. durans</i> ENSAIA 630	2
<i>L. innocua</i> 8811	3
<i>J. ivanovi</i> RJG 496	6

- 5 Le spectre d'inhibition de cette bactériocine apparaît comme assez étroit et limité aux souches de *Lactobacillus sakei* et *Pediococcus cerevisiae* pour les bactéries lactiques. Ce peptide apparaît, comme les autres bactériocines de classe IIa, actif contre toutes les souches de *Listeria* testées, ainsi que contre les *Enterococcus faecalis* et *durans* mais pas contre *Enterococcus faecium*.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une bactériocine, dénommée Sakacine G, issue de *Lactobacillus sakei* 2512.

5 2. Polypeptide isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une bactériocine de classe IIa.

 3. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N° 2 et/ou la séquence ID N° 4.
10

 4. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N° 12.

 5. Acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique codant un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4.
15

 6. Acide nucléique selon la revendication 5, comprenant la séquence ID N° 1 et/ou la séquence ID N° 3.

20 7. Acide nucléique selon la revendication 5 ou 6, comprenant la séquence d'acide nucléique SEQ ID N° 9.

 8. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N° 6.
25

 9. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N° 8.

 10. Acide nucléique comprenant la séquence ID N° 5.
30

 11. Acide nucléique comprenant la séquence ID N° 7.

12. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 7, 10 ou 11.

5 13. Cellule hôte transformée par un vecteur selon la revendication 12.

14. Cellule hôte selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un microorganisme choisi parmi les *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Escherichia* ou d'une levure.

10

15. Procédé de production d'un polypeptide recombinant dans lequel un vecteur comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 7, 10 ou 11 est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture des conditions permettant l'expression d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4, 8 ou 9 ou d'un polypeptide codé par une séquence d'acide nucléique telle que définie dans l'une des revendications 5 à 7, 10 ou 11.

16. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables dans la préparation de produits alimentaires.

20

17. Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que ledit polypeptide est mis en œuvre pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans les produits alimentaires.

25

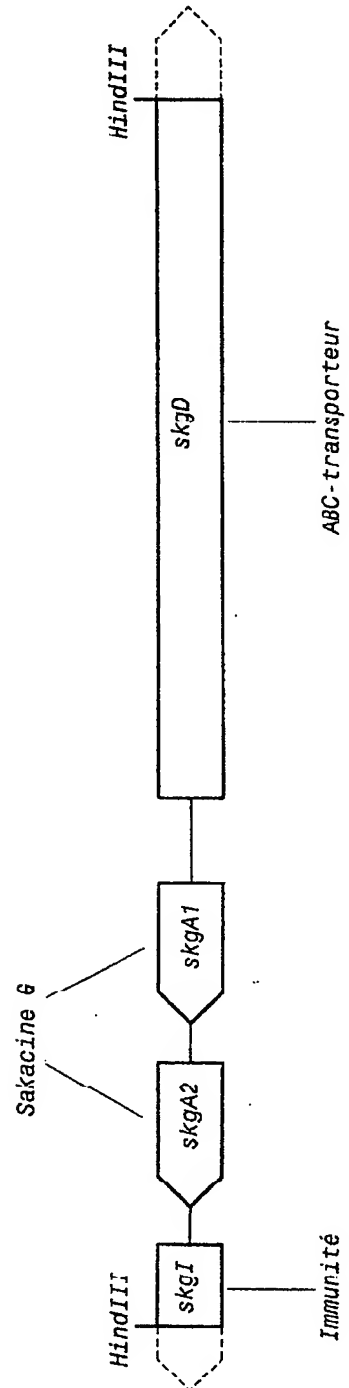
18. Utilisation selon la revendication 16 ou 17, caractérisée en ce que ledit polypeptide est produit dans le produit alimentaire à partir de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512.

30

19. Utilisation de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 dans des produits alimentaires pour y produire un polypeptide bactériocine selon l'une des revendications 1 à 4.

- 5 20. Composition bactériocine caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou la souche de *Lactobacillus Sakei* 2512.

1/1



LISTE DE SEQUENCES

<110> RHODIA FOOD

<120> BACTERIOCINE ANTI-LISTERIA

<130> BFF00/0609

<140>

<141>

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 196

<212> ADN

<213> Lactobacillus sake

<220>

<221> CDS

<222> (20)..(187)

<400> 1

ttaacaggag gtattcaaa atg aag aat aca cgt agc tta acg atc caa gaa 52
 Met Lys Asn Thr Arg Ser Leu Thr Ile Gln Glu
 1 5 10

ata aaa tcc atc aca ggt ggt aaa tac tat ggt aat ggt gtt agc tgt 100
 Ile Lys Ser Ile Thr Gly Gly Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys
 15 20 25

aac tct cat ggt tgt tca gta aat tgg ggg caa gca tgg act tgt ggg 148
 Asn Ser His Gly Cys Ser Val Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly
 30 35 40

gta aat cat cta gct aat ggc ggt cat ggg gtt tgt taa ttatttaa 196
 Val Asn His Leu Ala Asn Gly Gly His Gly Val Cys
 45 50 55

<210> 2

<211> 55

<212> PRT

<213> Lactobacillus sake

<400> 2

Met Lys Asn Thr Arg Ser Leu Thr Ile Gln Glu Ile Lys Ser Ile Thr
 1 5 10 15

Gly Gly Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys Asn Ser His Gly Cys
 20 25 30

Ser Val Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly Val Asn His Leu Ala
 35 40 45

Asn Gly Gly His Gly Val Cys
 50 55


```
<220>  
<221> CDS  
<222> (20)..(187)
```

```
<210> 4
<211> 55
<212> PRT
<213> Lactobacillus sake
```

```
<210> 5
<211> 181
<212> ADN
<213> Lactobacillus sake
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (24) .. (179)
```

```
<400> 5
ttaaaaaagg agacgtgatt aaa atg gca aac aaa gac aat att aaa act gaa 53
          Met Ala Asn Lys Asp Asn Ile Lys Thr Glu
                1                5                10
```

tct aaa aac aac atc gaa gct ctc ttg cac tta cta gaa aag cgt cct 101
 Ser Lys Asn Asn Ile Glu Ala Leu Leu His Leu Leu Glu Lys Arg Pro
 15 20 25

gta aaa tcc agt gaa tta ctc gat att att gac gtt ctt tcc caa gtt 149
 Val Lys Ser Ser Glu Leu Leu Asp Ile Ile Asp Val Leu Ser Gln Val
 30 35 40

tat agc aaa att gat ata gct aag aat ccc ga 181
 Tyr Ser Lys Ile Asp Ile Ala Lys Asn Pro
 45 50

<210> 6
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus sake

<400> 6
 Met Ala Asn Lys Asp Asn Ile Lys Thr Glu Ser Lys Asn Asn Ile Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu His Leu Leu Glu Lys Arg Pro Val Lys Ser Ser Glu Leu
 20 25 30

Leu Asp Ile Ile Asp Val Leu Ser Gln Val Tyr Ser Lys Ile Asp Ile
 35 40 45

Ala Lys Asn Pro
 50

<210> 7
 <211> 1203
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake

<220>
 <221> CDS
 <222> (20)..(1201)

<400> 7
 aaattaggag acttatata ttg ttt aat ctg ttg aga tac aaa aaa tta tat 52
 Leu Phe Asn Leu Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Tyr
 1 5 10

tgt tca caa gtg gat gaa gat gat tgt gga atc gca gct ttg aat atg 100
 Cys Ser Gln Val Asp Glu Asp Asp Cys Gly Ile Ala Ala Leu Asn Met
 15 20 25

att ttt aaa aat ttt ggt tcc gaa tat tca cta tca aaa ttg cga ttc 148
 Ile Phe Lys Asn Phe Gly Ser Glu Tyr Ser Leu Ser Lys Leu Arg Phe
 30 35 40

tta gca aaa acc agt caa caa ggg act act att ttt gga ctg ata aag 196
 Leu Ala Lys Thr Ser Gln Gln Gly Thr Thr Ile Phe Gly Leu Ile Lys
 45 50 55

gct gca gag gaa cta aat tta gaa gcg aat gca tta caa gct gat atg 244

Ala	Ala	Glu	Glu	Leu	Asn	Leu	Glu	Ala	Asn	Ala	Leu	Gln	Ala	Asp	Met	
60					65					70					75	
ggc	atc	ttt	aaa	gat	gaa	aat	tta	atg	cta	cca	atc	att	gca	cat	gtt	292
Gly	Ile	Phe	Lys	Asp	Glu	Asn	Leu	Met	Leu	Pro	Ile	Ile	Ala	His	Val	
			80					85					90			
tta	aag	caa	gga	aaa	gtt	ctg	cat	tac	tac	gtt	gta	ttt	gat	gtt	tcg	340
Leu	Lys	Gln	Gly	Lys	Val	Leu	His	Tyr	Tyr	Val	Val	Phe	Asp	Val	Ser	
		95					100					105				
aaa	gac	ttt	tta	att	att	ggt	gac	cca	gac	cca	aca	ata	gga	att	acg	388
Lys	Asp	Phe	Leu	Ile	Ile	Gly	Asp	Pro	Asp	Pro	Thr	Ile	Gly	Ile	Thr	
	110					115					120					
gaa	atc	tcc	aaa	aag	gat	ttt	gaa	aat	gaa	tgg	acg	ggt	aat	ttc	ata	436
Glu	Ile	Ser	Lys	Lys	Asp	Phe	Glu	Asn	Glu	Trp	Thr	Gly	Asn	Phe	Ile	
	125				130					135						
aca	ttt	tca	aaa	gga	aag	aac	ttt	gtt	tca	gag	aag	cag	aga	aat	aac	484
Thr	Phe	Ser	Lys	Gly	Lys	Asn	Phe	Val	Ser	Glu	Lys	Gln	Arg	Asn	Asn	
	140			145					150					155		
agt	tta	ctc	aag	ttt	att	cct	att	ttg	aga	cag	caa	aaa	tcc	cta	ata	532
Ser	Leu	Leu	Lys	Phe	Ile	Pro	Ile	Leu	Arg	Gln	Gln	Lys	Ser	Leu	Ile	
			160					165					170			
ttc	tgg	ata	gct	ttc	gcc	gca	ata	cta	ttg	atg	ata	att	agt	att	gca	580
Phe	Trp	Ile	Ala	Phe	Ala	Ala	Ile	Leu	Leu	Met	Ile	Ile	Ser	Ile	Ala	
		175					180					185				
gga	tca	ctt	ttt	tta	gaa	caa	ctt	gta	gat	ata	tat	ata	cca	cac	aaa	628
Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Glu	Gln	Leu	Val	Asp	Ile	Tyr	Ile	Pro	His	Lys	
		190				195					200					
aat	atg	gat	aca	ttg	ggg	att	atc	tcg	att	tgc	tta	att	gga	gcc	tat	676
Asn	Met	Asp	Thr	Leu	Gly	Ile	Ile	Ser	Ile	Cys	Leu	Ile	Gly	Ala	Tyr	
	205				210					215						
ctt	tta	cag	gcc	gta	atg	acg	tat	ttt	cag	aat	ttt	tta	cta	act	ata	724
Leu	Leu	Gln	Ala	Val	Met	Thr	Tyr	Phe	Gln	Asn	Phe	Leu	Leu	Thr	Ile	
	220			225					230				235			
ttt	gga	caa	aat	ctt	tct	aga	aaa	att	att	tta	aat	tat	att	aat	cac	772
Phe	Gly	Gln	Asn	Leu	Ser	Arg	Lys	Ile	Ile	Leu	Asn	Tyr	Ile	Asn	His	
			240				245						250			
ctt	ttt	gaa	tta	ccc	atg	tct	ttc	ttc	tca	aca	cgt	aga	gtt	ggc	gaa	820
Leu	Phe	Glu	Leu	Pro	Met	Ser	Phe	Phe	Ser	Thr	Arg	Arg	Val	Gly	Glu	
		255					260					265				
ata	gtc	tct	cgg	ttt	aca	gat	gca	agc	aag	att	ata	gat	gct	ttg	gca	868
Ile	Val	Ser	Arg	Phe	Thr	Asp	Ala	Ser	Lys	Ile	Ile	Asp	Ala	Leu	Ala	
		270				275						280				
agt	acg	att	ttg	act	ctc	ttt	tta	gat	gtt	tgg	atg	ttg	gtt	aca	atc	916
Ser	Thr	Ile	Leu	Thr	Leu	Phe	Leu	Asp	Val	Trp	Met	Leu	Val	Thr	Ile	
	285					290				295						
tca	atc	gtt	ctc	gta	ttt	tta	aat	aca	aag	tta	ttt	atg	att	tct	ctg	964
Ser	Ile	Val	Leu	Val	Phe	Leu	Asn	Thr	Lys	Leu	Phe	Met	Ile	Ser	Leu	

```

<400> 8
Leu Phe Asn Leu Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Tyr Cys Ser Gln Val Asp
  1      .           5              10              15

Glu Asp Asp Cys Gly Ile Ala Ala Leu Asn Met Ile Phe Lys Asn Phe
      20              25              30

Gly Ser Glu Tyr Ser Leu Ser Lys Leu Arg Phe Leu Ala Lys Thr Ser
      35              40              45

Gln Gln Gly Thr Thr Ile Phe Gly Leu Ile Lys Ala Ala Glu Glu Leu
      50              55              60

Asn Leu Glu Ala Asn Ala Leu Gln Ala Asp Met Gly Ile Phe Lys Asp
  65              70              75              80

Glu Asn Leu Met Leu Pro Ile Ile Ala His Val Leu Lys Gln Gly Lys
      85              90              95

Val Leu His Tyr Tyr Val Val Phe Asp Val Ser Lys Asp Phe Leu Ile
      100             105             110

Ile Gly Asp Pro Asp Pro Thr Ile Gly Ile Thr Glu Ile Ser Lys Lys
      115             120             125

Asp Phe Glu Asn Glu Trp Thr Gly Asn Phe Ile Thr Phe Ser Lys Gly
      130             135             140

Lys Asn Phe Val Ser Glu Lys Gln Arg Asn Asn Ser Leu Leu Lys Phe
  145             150             155             160

Ile Pro Ile Leu Arg Gln Gln Lys Ser Leu Ile Phe Trp Ile Ala Phe
      165             170             175

```

Ala Ala Ile Leu Leu Met Ile Ile Ser Ile Ala Gly Ser Leu Phe Leu
 180 185 190

Glu Gln Leu Val Asp Ile Tyr Ile Pro His Lys Asn Met Asp Thr Leu
 195 200 205

Gly Ile Ile Ser Ile Cys Leu Ile Gly Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Val
 210 215 220

Met Thr Tyr Phe Gln Asn Phe Leu Leu Thr Ile Phe Gly Gln Asn Leu
 225 230 235 240

Ser Arg Lys Ile Ile Leu Asn Tyr Ile Asn His Leu Phe Glu Leu Pro
 245 250 255

Met Ser Phe Phe Ser Thr Arg Arg Val Gly Glu Ile Val Ser Arg Phe
 260 265 270

Thr Asp Ala Ser Lys Ile Ile Asp Ala Leu Ala Ser Thr Ile Leu Thr
 275 280 285

Leu Phe Leu Asp Val Trp Met Leu Val Thr Ile Ser Ile Val Leu Val
 290 295 300

Phe Leu Asn Thr Lys Leu Phe Met Ile Ser Leu Val Ser Ile Pro Val
 305 310 315 320

Tyr Ser Val Ile Ile Tyr Ala Phe Lys Asn Thr Phe Asn Gly Leu Asn
 325 330 335

His Lys Ser Met Glu Asn Ala Ala Leu Leu Asn Ser Ala Ile Ile Glu
 340 345 350

Asn Val Thr Gly Ile Glu Thr Val Lys Ser Leu Thr Ser Glu Glu Phe
 355 360 365

Ser Tyr Asn Gln Ile Thr Asp Arg Phe Glu Asn Phe Leu Asn Ser Ser
 370 375 380

Leu Arg Tyr Thr Ile Ala Asp Gln Gly Gln
 385 390

<210> 9

<211> 4094

<212> ADN

<213> Lactobacillus sake

<400> 9

agcttcggga ttcttagcta tatcaatttt gctataaaact tgggaaagaa cgtcaataat 60
 tcgaagccct aagaatcgat atagttaaaa cgatatttga accctttctt gcagttatta 120
 atcgaytaat tcaactggatt ttaacaggaat cttttctagt aagtgcaga gagcttcgat 180
 tagctcatta agtgacctaa aatgtcctgc gaaaagatca ttcacgttct ctggaagcta 240
 gttgttttta gattcagttt taatatgtc tttgtttgcc attttaatca cgtctccttt 300
 caacaaaaat ctaagtcaaa attataacag aaacaaaacgg taaaattagt gcagaggaaa 360
 tttatagtaa taaaaaaaac acaattaaat tagtgctttt ttatctggta attaaadaac 420
 aaatatcatt attttttttg tgtaattta atcacgaaaa aatagaccat taattgtttg 480
 tccatgaccg ccattagcta gatggtttac tccacaagtc catgcttgcc cccaatttac 540
 aggtactggc ggtaatcgat ctaccaaatt aggtgttcag gtacgaacgg ggggttaaatg 600

```

tgaacagccg tgagagttac aqctaacgcc attaccatag tatttaccac ctgtaataga 660
acttgtcggc actctcaatg tcgattgagg taatgggtatc ataaatgggtg gacattatct 720
tttcatttct tgaattgtta ggctttttgc gtttttcata aagaacatct ccaaattata 780
aaagtaaaga acttaacaat cggaaaaacg caaaaagtat ttcttgtaga ggtttaatat 840
tttttttagt attcttgaag ttctgttgta acgcagaatt ttggaagaat gagtacttgt 900
aaaaaatcac taagaacttc aagacaacat tgcgtcttaa aaccttctta ctcatgaaca 960
tagaaatttg cggatttaaa taattaacaa accccatgac cgccattagc tagatgattt 1020
atctttaaac ggctaaattt attaattggt tgggggtactg gcggtaatcg atctactaaa 1080
ccccacaaag tccatgcttg cccccaattt actgaacaac catgagagtt acagctaaac 1140
tggggtgttc aggtacgaac ggggggttaa tgacttggtg gtactctcaa tgcogattgt 1200
ccattaccat agtatttacc acctgtgatg gattttattt cttggatcgt taagctacgt 1260
ggtaatggta tcataaatgg tggacactac ctaaaataaa gaacctagca attcgatgca 1320
gtattcttca ttttgaatac ctctgtttaa ataattttta cagatcaght gtagttctaa 1380
cataagaagt aaaacttatg gaggacaatt tattaaaaat gtgctagtca catcaagatt 1440
tgtgaatttg tgtcaagttt agcaaatata tatttttaggc atggaaaaac ttgcttttaa 1500
acactttaac acagttcaaa tcgttttatat ataaaatccg tacccttttg aacgaaaatt 1560
ttcgacttga ctataacggt ataatactgg tattactata ttgttttagc ttacaaaaaa 1620
aagctgaact gatattgcca tattatgacc ataagtatat aaacaaatcg aagtgttttt 1680
aattaggaga cttatatatt gttaaactct ttgagatata aaaaattata ttgttcacaa 1740
ttaatcctct gaatatataa caaattagac aactctatgt tttttaatat aacaagtgtt 1800
gtggatgaag atgattgtgg aatcgcgact ttgaatttga tttttaaaaa ttttgggttc 1860
cacctacttc tactaacacc tttagcttga aacttatact aaaaattttt aaaaccaagg 1920
gaatattcac tatcaaaatt gcgattctta gcaaaaacca gtcaacaagg gactactatt 1980
cttataagtg atagttttta cgctaagaat cgtttttggt cagttgttcc ctgatgataa 2040
tttgactga taaaggctgc agaggaacta aatttagaag cgaatgcatt acaagctgat 2100
aaactgtact atttcgcag tctccttgat tttaactctc gcttacgtaa tgttcgacta 2160
atgggcatct ttaaagatga aaatttaatg ctaccaatca ttgcacatgt tttaaagcaa 2220
taccgtaga aatttctact tttaatttac gatggttagt aacgtgtaca aaatttcggt 2280
ggaaaagttc tgcattacta cgttgtattt gatgtttcga aagacttttt aattattggt 2340
ccttttcaag acgtaatgat gcaacataaa ctacaaagct ttctgaaaaa ttaataacca 2400
gaccagacc caacaatagg aattacggaa atctccaaaa aggattttga aaatgaatgg 2460
ctgggtcttg gttgttatcc ttaatgcctt tagaggtttt tcttaaaaact tttacttacc 2520
acgggtaatt tcataacatt ttcaaaagga aagaactttg ttccagagaa gcagagaaat 2580
tgcccattaa agtattgtaa aagttttctt ttcttgaaac aaagtctctt cgtctcttta 2640
aacagtttac tcaagtttat tctatttttg agacagcaaa aatccctaatt attctggata 2700
ttgtcaaatg agttcaataa aggataaaac tctgtcgttt ttagggttta taagacctat 2760
gctttcgccg caatactatt gatgataatt agtatttgcag gatcaacttt tttagaacia 2820
cgaaagcggc gttatgataa ctactattaa tcataacgct ctagtgaaaa aaatcttgtt 2880
ctttagataa tatatatacc acacaaaaat atggatcat tggggattat ctogatttgc 2940
gaacatctat atatatatgg tgtgttttta tacctatgta acccctaata gagctaaacg 3000
ttaattggag cctatctttt acaggcngga atgacgtatt ttcaaattt tttactaact 3060
aattaacctc ggatagaaaa tgtccggcat tactgcataa aagtcttaaa aaatgattga 3120
atatttggac aaaatctttc tagaaaaatt attttaatt atattaatca cctttttgaa 3180
tataaacctg ttttagaaag atctttttta taaaatttaa tataattagt ggaaaaactt 3240
ttaccatgt ctttcttctc aacacgtaga gttggngaaa tagtctctcg gtttacagat 3300
aatgggtaca gaaagaagag ttgtgcactc caaccgcttt atcagagagc caaatgtcta 3360
gcaagcaaga ttatagatgc ttggcaagt acgattttga ctctcttttt agatgtttgg 3420
gcttcgttct aatatctacg aaaccgttca tgctaaaact gagagaaaaa tctacaaacc 3480
atgttggtta caatctcaat cgttctcgta tttttaaata caaagttatt tatgatttct 3540
tacaaccaat gtttagagta gcaagagcat aaaaatttat gtttcaataa atactaaaga 3600
ctggtatcta taccggtgta ctacgttata atttatgctt ttaaaaatac atttaatggc 3660
gaccatagat atggccacat gagtcaatat taaatacgca aatttttatg taaattaccg 3720
ctgaaccata aatcaatgga aaatgcagca ttattgaaat ctgcaataat cgaaaaagta 3780
gacttggtat tttagttacct tttagctcgt aataacttaa gacgttatta gcttttgcac 3840
actggcatag aaactgtaaa atcatttaact tcagaagaat ttctctacaa tcaaatcact 3900
tgaccgtatc tttgacattt tagtaattga agtcttctta aaaggatgtt agtttagtga 3960
gataagttcg aaaattttct taacagttcc ttacgggtata cgatagctga ccaaggacag 4020
ctatctaagc tttttaaaga attgtcaagg aatgccatat gctatcgact gggtcctgtc 4080
caagcttgtt cgaa
4094

```

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake

<400> 10
 aartattatg gnaayggngt

20

<210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake

<400> 11
 acatgatgnc cncrrtngc

20

<210> 12
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus sake

<400> 12
 Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys Asn Ser His Gly Cys Ser Val
 1 5 10 15

Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly Val Asn His Leu Ala Asn Gly
 20 25 30

Gly His Gly Val Cys
 35

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☐ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

N° d'enregistrement national : 00 13407

N° de publication :

2809404

1.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	
2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL	
<p>HUGAS M ET AL: "Application of the bacteriocinogenic Lactobacillus sakei CTC494 to prevent growth of Listeria in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres" FOOD MICROBIOL., vol. 15, 1998, pages 639-650, XP000982835 ISSN: 0021-8847</p> <p>AXELSSON L ET AL: "THE GENES INVOLVED IN PRODUCTION OF AND IMMUNITY TO SAKACIN A, A BACTERIOICIN FROM LACTOBACILLUS SAKE LB706" JOURNAL OF BACTERIOLOGY,US,WASHINGTON, DC, vol. 177, no. 8, 1 avril 1995 (1995-04-01), pages 2125-2137, XP000673873 ISSN: 0021-9193</p> <p>HUEHNE KATHRIN ET AL: "Analysis of the sakacin P gene cluster from Lactobacillus sake Lb674 and its expression in sakacin-negative Lb. sake strains." MICROBIOLOGY (READING), vol. 142, no. 6, 1996, pages 1437-1448, XP000982832 ISSN: 1350-0872</p>	
3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	